

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

09.06.2004

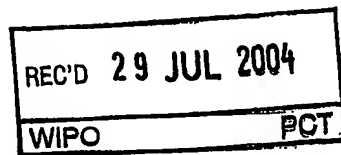
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 6 月 1 0 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 6 5 3 9 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 6 5 3 9 0]

出 願 人 株式会社島津製作所
Applicant(s):

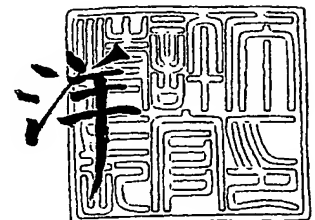


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 1 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 A5965

【提出日】 平成15年 6月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 21/02

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市福島区大開 4 - 1 - 1 8 6 レンゴー株式会社 中央研究所内

 【氏名】 鈴木 崇

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市福島区大開 4 - 1 - 1 8 6 レンゴー株式会社 中央研究所内

 【氏名】 江連 徹

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市福島区大開 4 - 1 - 1 8 6 レンゴー株式会社 中央研究所内

 【氏名】 伊東 昌章

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市福島区大開 4 - 1 - 1 8 6 レンゴー株式会社 中央研究所内

 【氏名】 東出 将賢

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市福島区大開 4 - 1 - 1 8 6 レンゴー株式会社 中央研究所内

 【氏名】 遠藤 幸喜

【特許出願人】

 【識別番号】 000115980

 【氏名又は名称】 レンゴー株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島・一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9712337

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 哺乳動物培養細胞抽出液およびその調製方法、ならびに該抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有する、哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法。

【請求項 2】 さらに急激に凍結させた後、哺乳動物培養細胞を解凍し、遠心分離する工程を含む、請求項 1 に記載の調製方法。

【請求項 3】 急激な凍結が、液体窒素によって行われるものである、請求項 1 または 2 に記載の調製方法。

【請求項 4】 急激に凍結された哺乳動物培養細胞の解凍が、4℃～20℃の水浴中で行われるものである、請求項 2 または 3 に記載の調製方法。

【請求項 5】 抽出用液がプロテアーゼインヒビターを含有するものである、請求項 1～4 のうちのいずれかに記載の調製方法。

【請求項 6】 哺乳動物培養細胞が、リンパ腫由来の培養細胞である、請求項 1～5 のうちのいずれかに記載の調製方法。

【請求項 7】 請求項 1～6 のいずれかに記載の方法で調製された、哺乳動物培養細胞抽出液。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の哺乳動物培養細胞抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、哺乳動物培養細胞抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成方法、ならびに上記抽出液の調製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、ヒトゲノムを始め多くの生物の遺伝情報が解読されてきている。このような中、ポストゲノム研究として、これらの遺伝情報に対応するタンパク質の機

能解析やゲノム創薬が注目を集めている。これらの遺伝情報に対応するタンパク質を医薬品などに応用、利用するには、莫大な種類のタンパク質を短時間で簡単に合成することが必要となってくる。

【0003】

現在、タンパク質の生産方法には、遺伝子組換え技術によって酵母や哺乳動物培養細胞などの生細胞を用いる発現系（以下、「細胞系」ということがある）が広く利用されている。しかし、生細胞は自己機能を維持するために外来タンパク質を排除する傾向があり、また生細胞で細胞毒タンパク質を発現すると細胞が生育しないなど発現が困難なタンパク質も多い。

【0004】

一方、細胞系を使用しないタンパク質の生産方法として、細胞破碎液や抽出液に基質や酵素などを加えるなどして生物の遺伝情報翻訳系を試験管内に取り揃え、目的のタンパク質をコードするmRNAを用いて、アミノ酸を望みの順番に必要な残基数結合させることのできる合成系を再構築する、無細胞系のタンパク質合成が知られている。このような無細胞系タンパク質合成では、上記細胞系のタンパク質合成のような制約を受けにくく、生物の命を断つことなくタンパク質の合成を行うことができ、またタンパク質の生産に培養などの操作を伴わないため細胞系と比較して短時間にタンパク質の合成を行うことができる。さらに無細胞系タンパク質合成では、生命体が利用していないアミノ酸配列からなるタンパク質の大量生産も可能となることから、有望な発現方法であると期待されている。このような無細胞系のタンパク質合成に供する細胞破碎液や抽出液として、種々の生物由来のものを使用することが検討され、研究が進められている。

【0005】

無細胞系タンパク質合成用抽出液としては、従来より様々なものが知られているが、翻訳後の糖鎖修飾などを考慮すると、ヒトタンパク質を完全な活性を保持した状態で発現させ得るため、ヒト細胞により近縁な哺乳動物培養細胞由来の抽出液であることが望ましいと考えられる。現在、哺乳動物培養細胞由来の無細胞系タンパク質合成用抽出液としては、ウサギ網状赤血球の系（たとえば、非特許文献1を参照）、Chinese hamster ovary（CHO）の系（たとえば、特許文献

1を参照)が報告されている。

【0006】

しかしながら、ウサギ網状赤血球の系では、ウサギにアセチルフェニルヒドラジン溶液を皮下注射し、投与4～5日後にウサギの耳から採血し、そこからライセートを調製するという非常に煩雑な操作を伴う。また、CHOの系では、不活性ガスの雰囲気中、加圧下のCHOを減圧させることによって細胞を破碎して、その抽出液を調製するが、この方法では、抽出液の作製に際し特別な装置や器具が必要である。さらに、抽出液調製時の細胞数やガス圧、加圧時間によって無細胞系でのタンパク質合成能が大きく影響されるため、条件設定に煩雑な操作を要する。また、かかる方法によって得られた抽出液では、合成できるタンパク質の量は極めて少なく、放射能標識を行ったアミノ酸の取り込みによってのみ、そのタンパク質合成活性を測定できるという程度である。

このため、調製が容易であり、かつタンパク質合成量の高い哺乳動物培養細胞由来抽出液およびその調製方法の開発が望まれている。

【0007】

【特許文献1】

特開2000-325076号公報

【非特許文献1】

Pelham et al., Eur. J. Biochem. 67, 247-256(1976)

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題を解決するためになされたものであって、その目的とするところは、調製が容易であり、かつ従来よりもタンパク質合成量の高い無細胞系タンパク質合成用の哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法、および該哺乳動物培養細胞抽出液、ならびにこの哺乳動物培養細胞抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、本発明を完成

するに至った。即ち、本発明は以下のとおりである。

〔1〕抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有する、哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法。

〔2〕さらに急激に凍結させた後、哺乳動物培養細胞を解凍し、遠心分離する工程を含む、上記〔1〕に記載の調製方法。

〔3〕急激な凍結が、液体窒素によって行われるものである、上記〔1〕または〔2〕に記載の調製方法。

〔4〕急激に凍結された哺乳動物培養細胞の解凍が、4℃～20℃の水浴中で行われるものである、上記〔2〕または〔3〕に記載の調製方法。

〔5〕抽出用液がプロテアーゼインヒビターを含有するものである、上記〔1〕～〔4〕のうちのいずれかに記載の調製方法。

〔6〕哺乳動物培養細胞が、リンパ腫由来の培養細胞である、上記〔1〕～〔5〕のうちのいずれかに記載の調製方法。

〔7〕上記〔1〕～〔6〕のいずれかに記載の方法で調製された、哺乳動物培養細胞抽出液。

〔8〕上記〔7〕に記載の哺乳動物培養細胞抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成方法。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、哺乳動物培養細胞から抽出を行って哺乳動物培養細胞抽出液を調製する方法であって、抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有することをその大きな特徴とするものである。このような方法によって哺乳動物培養細胞抽出液を調製することで、上記特許文献1に記載の従来の手法と比較して、より緩和な状態で細胞の破碎を行うことができ、無細胞系タンパク質合成に必須な成分を破壊することなく細胞外に取り出すことができるので、従来よりも無細胞系にてタンパク質の合成量の高い哺乳動物培養細胞抽出液を容易に調製することができる。さらに本発明の方法によれば、使用器具などからのRNaseなどの混入も防ぐことができ、また、界面活性剤などの試

薬を用いた細胞破碎法の場合に懸念される翻訳反応を阻害するような物質の持込みもない。

【0011】

本発明の調製方法では、抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させることを要する。本発明の調製方法において、「急激に凍結」とは、10秒以下、好ましくは2秒以下にて、哺乳動物培養細胞を凍結させることを指す。本発明において、哺乳動物培養細胞の凍結を急激に行わなかった場合には、タンパク質合成に必須な成分が不活化する虞があるため、本発明の上記効果を達成することができない。

上記のように哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる温度としては、通常 -80°C 以下であり、好ましくは -150°C 以下である。 -80°C を越える温度で急激に凍結させると、タンパク質合成に必須な成分が失活してタンパク質合成能が低下してしまう傾向にあるためである。

【0012】

上記哺乳動物培養細胞の急激な凍結は、たとえば、液体窒素や液体ヘリウムなどの不活性ガスを使用することなどによって実現できるが、入手が容易であり安価な液体窒素を用いて行うのが好ましい。

【0013】

本発明の調製方法においては、哺乳動物培養細胞からの抽出に際して、抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有しているならば、その他の工程について特に制限はない。たとえば、乳鉢中で乳棒を用いてすり潰す方法、ダウンスホモジナイザーを用いる方法、ガラスビーズを用いる方法など、大腸菌や小麦胚芽などから無細胞系タンパク質合成用の抽出液を得る際に従来より行われていた種々の手法にて哺乳動物培養細胞を破碎し、抽出を行ってもよいが、哺乳動物培養細胞は、大腸菌や小麦胚芽などから無細胞系タンパク質合成用の抽出液を得る場合と比較して細胞の破碎が容易であり、さらには、この凍結・解凍によるだけの破碎法により得られた抽出液にはタンパク質合成に必須な成分が活性を保持した状態で含まれているという理由によりタンパク質合成能の高い抽出液を得ることができるという利点もあることから、上記哺乳

動物培養細胞を急激に凍結させた後、解凍し、遠心分離することによって哺乳動物培養細胞を破碎するのが好ましい。

【0014】

上記急激に凍結した哺乳動物培養細胞を、解凍した後、遠心分離する場合、解凍は、たとえば4℃～20℃の水浴中での解凍、室温（25℃）にての放置などによって実現できるが、タンパク質合成に必須な成分の失活を防止し、タンパク質合成能の低下を確実に防ぐことから、4℃～20℃（特には、4℃～10℃）の水浴中で解凍を行うのが好ましい。

解凍した哺乳動物培養細胞の遠心分離は、当分野において通常行われている条件（10,000×g～50,000×g、0℃～10℃、10分間～60分間）で行えばよい。

【0015】

本発明に用いる哺乳動物培養細胞としては、特に制限はなく、たとえば、ヒト、ラット、マウス、サルなどの従来公知の適宜の哺乳動物由来の培養細胞を使用することができる。

また、本発明における哺乳動物培養細胞としては、いかなる組織由来の細胞であってもよく、たとえば、血球細胞、生殖巣由来細胞、リンパ腫（リンホーマ）由来細胞、その他の腫瘍細胞、幹細胞などを特に制限なく使用することができる。中でも浮遊培養が可能であるため、培養および継代が容易であることから、リンパ腫由来細胞を使用するのが好ましい。

【0016】

なお本発明においては、単一種の哺乳動物における単一の組織由来の哺乳動物培養細胞に限らず、単一種の哺乳動物における複数種の組織由来の哺乳動物培養細胞より抽出を行ってもよく、複数種の哺乳動物における単一の組織由来の哺乳動物培養細胞より抽出を行ってもよく、無論、複数種の哺乳動物における複数種の組織由来の哺乳動物培養細胞より抽出を行ってもよい。

【0017】

本発明の調製方法に用いられる抽出用液は、特に制限されるものではないが、プロテアーゼインヒビターを少なくとも含有するのが好ましい。プロテアーゼイ

ンヒビターを含有する抽出用液を用いると、哺乳動物培養細胞由来の抽出物に含有されるプロテアーゼの活性が阻害され、当該プロテアーゼによる抽出物中の活性タンパクの不所望な分解を防止でき、結果として哺乳動物培養細胞由来の抽出物が有するタンパク質合成能を有効に引き出すことができるようになるという利点がある。

【0018】

上記プロテアーゼインヒビターとしては、プロテアーゼの活性を阻害し得るものであるならば特に制限はなく、たとえば、フェニルメタンスルホニルフルオリド（以下、「PMSF」ということがある。）、アプロチニン、ベスタチン、ロイペプチン、ペプスタチンA、E-64（L-*trans*-エポキシスクシニルロイシルアミド-4-グアニジノブタン）、エチレンジアミン四酢酸、ホスホラミドンなどを使用することができるが、哺乳動物培養細胞由来の抽出液にはセリンプロテアーゼが含まれることから、上記中でもセリンプロテアーゼに対して特異性の高いインヒビターとして働くPMSFを使用するのが好ましい。また、1種類のプロテアーゼインヒビターのみならず、数種類の混合物（プロテアーゼインヒビターカクテル）を用いてもよい。

【0019】

当該抽出用液中におけるプロテアーゼインヒビターの含有量に特に制限はないが、本発明の作用に必須な酵素類の分解阻害能を好適に発揮できる観点から、1 μ M～50 mM含有されることが好ましく、0.01 mM～5 mM含有されることがより好ましい。プロテアーゼインヒビターが1 μ M未満であると、プロテアーゼの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またプロテアーゼインヒビターが50 mMを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

【0020】

また本発明に用いる抽出用液は、上記プロテアーゼインヒビターに加えて、カリウム塩、マグネシウム塩、ジチオトレイトールおよび緩衝剤を少なくとも含有するのが好ましい。

【0021】

上記カリウム塩としては、本発明の作用を阻害するようなものでなければ特に制限はなく、たとえば酢酸カリウム、炭酸カリウム、炭酸水素カリウム、塩化カリウム、リン酸水素二カリウム、クエン酸水素二カリウム、硫酸カリウム、リン酸二水素カリウム、ヨウ化カリウム、フタル酸カリウムなど一般的な形態で使用するができ、中でも酢酸カリウムを使用するのが好ましい。カリウム塩は、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

【0022】

当該抽出用液中におけるカリウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸カリウムなど1価のカリウム塩である場合、10 mM～500 mM含有されることが好ましく、20 mM～300 mM含有されることがより好ましい。カリウム塩が10 mM未満または500 mMを越えると、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0023】

上記マグネシウム塩としては、本発明の作用を阻害するようなものでなければ特に制限はなく、たとえば酢酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、クエン酸マグネシウム、リン酸水素マグネシウム、ヨウ化マグネシウム、乳酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、シュウ酸マグネシウムなど一般的な形態で使用するができ、中でも酢酸マグネシウムを使用するのが好ましい。マグネシウム塩も、タンパク質合成反応における補助因子として作用する。

【0024】

当該抽出用液中におけるマグネシウム塩の含有量に特に制限はないが、保存安定性の観点から、たとえば酢酸マグネシウムなど2価の塩である場合、0.1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.5 mM～5 mM含有されることがより好ましい。マグネシウム塩が0.1 mM未満または10 mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0025】

上記ジチオトレイトール（以下、「DTT」ということがある。）は、酸化防止の目的で配合されるものであり、当該抽出用液中において0.1 mM～10 mM含有されることが好ましく、0.5 mM～5 mM含有されることがより好まし

い。DTTが0.1mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0026】

上記緩衝剤は、緩衝能を付与し、抽出用液による抽出により調製された抽出液（＝抽出用液＋抽出物）において、たとえば酸性または塩基性物質の添加などによって起こるpHの急激な変化による抽出物の変性を防止する目的で配合される。このような緩衝剤としては、特に制限はなく、たとえば、HEPES-KOH、Tris-HCl、酢酸-酢酸ナトリウム、クエン酸-クエン酸ナトリウム、リン酸、ホウ酸、MES、PIPESなどを使用することができる。

緩衝剤は、得られた抽出液のpHが4～10に保持されるようなものを使用するのが好ましく、pHが6～8.5に保持されるようなものを使用するのがより好ましい。抽出液のpHが4未満またはpHが10を越えると、本発明の反応に必須な成分が変性する虞があるためである。このような観点より、上記中でもHEPES-KOH（pH6～8.5）を使用するのが特に好ましい。

【0027】

当該抽出用液中における緩衝剤の含有量に特に制限はないが、好適な緩衝能を保持する観点から、5mM～200mM含有されることが好ましく、10mM～100mM含有されることがより好ましい。緩衝剤が5mM未満であると、酸性または塩基性物質の添加によりpHの急激な変動を引き起こし、これを用いて調製した抽出液において抽出物の変性する傾向にあるためであり、また緩衝剤が200mMを越えると、塩濃度が高くなり過ぎ、タンパク質合成に必須な成分が不安定になる傾向にあるためである。

【0028】

本発明の哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法において、細胞破碎後から、無細胞系タンパク質合成用の哺乳動物培養細胞抽出液を得るまでの手順等については特に制限されるものではない。

たとえば、抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる工程の後に、解凍し、遠心分離する場合には、この遠心分離後の上清（上清1）をそのまま哺乳動物培養細胞抽出液としてもよいし、また、上清1をさらに遠心分離し

て、得られた上清（上清2）を哺乳動物培養細胞抽出液としてもよい。上記上清1の遠心分離の条件としては、上述したのと同様の条件（10, 000×g～50, 000×g、0℃～10℃、10分間～60分間）で行えばよい。

【0029】

なお上述のようにそれぞれ調製した後に、ゲル濾過を施し、ゲル濾過後の濾液より280nmにおける吸光度が最も高い画分付近を分取して抽出液として調製するようにしてもよい。しかしながらタンパク質の合成効率の観点からは、当該ゲル濾過および画分の分取を経ずに抽出液として調製するのが好ましい。

【0030】

なお、上記ゲル濾過を施し、ゲル濾過後の濾液より280nmにおける吸光度が最も高い画分付近を分取する場合には、具体的には以下の手順にて行えばよい。

たとえば脱塩カラム PD-10（アマシャム バイオサイエンス社製）を用いて、常法にしたがって、ゲル濾過用緩衝液にてカラムを平衡化した後、試料を供給し、上記抽出用液にて溶出する、というような条件にて行う。上記ゲル濾過用緩衝液としては、従来公知の適宜の組成のものを特に制限なく使用することができ、たとえば、10mM～100mMのHEPES-KOH（pH6～8.5）、20mM～300mMの酢酸カリウム、0.5mM～5mMの酢酸マグネシウム、0.5mM～5mMのDTT、0.01mM～5mMのPMSFを含有するゲル濾過用緩衝液を用いることができる。ゲル濾過して得られる濾液は、通常のゲル濾過で行われているように、0.1mL～1mLを1画分とすればよく、高いタンパク質合成能を有する画分を効率よく分取するという観点より、0.4mL～0.6mLを1画分とするのが好ましい。

次に、ゲル濾過後の濾液より280nmにおける吸光度が10以上の画分を分取する。当該処理は、たとえばUltrasp3300pro（アマシャム バイオサイエンス社製）などの機器を用いて、各画分について上記280nmにおける吸光度を測定し、この吸光度が最も高い画分付近を分取し、これを抽出液とする。

【0031】

なお、本発明の調製方法に供する哺乳動物培養細胞は、培養に用いる培地の翻訳反応液への持込みを避けるため、上記急激な凍結を行う前に、洗浄液にて予め洗浄しておくのが好ましい。洗浄液の組成としては、上述した抽出用液と同様の組成のものであればよい。洗浄液での洗浄は、哺乳動物培養細胞に洗浄液を添加し、これを遠心分離（たとえば、 $700\times g$ 、10分間、 4°C という条件）することによって行う。

洗浄に用いる洗浄液の量は、培地を完全に洗い流すという理由から、湿重量1gの哺乳動物培養細胞に対し5mL～100mLであるのが好ましく、10mL～50mLであるのがより好ましい。

洗浄回数は、1回～5回行うのが好ましく、2回～4回行うのがより好ましい。

。

【0032】

また本発明の調製方法に供する哺乳動物培養細胞の量は、特に制限されるものではないが、抽出効率を最適に保つため、抽出用液1mLに対して0.1g～5gであるのが好ましく、0.5g～2gであるのがより好ましい。

【0033】

本発明の方法にて調製された哺乳動物培養細胞抽出液は、無細胞系タンパク質合成用として好適に使用することができる。哺乳動物培養細胞抽出液は、哺乳動物培養細胞由来の抽出物をタンパク質濃度で 1mg/mL ～ 200mg/mL 含有することが好ましく、 10mg/mL ～ 100mg/mL 含有することがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で 1mg/mL 未満であると、本発明の作用に必須な成分の濃度が低くなり、十分な合成反応が行えなくなる虞があるためであり、また当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で 200mg/mL を越えると、抽出液自体が高い粘性を有し、操作しづらい虞があるためである。

。

該抽出液中の哺乳動物培養細胞由来の抽出物の含有量は、タンパク質濃度を測定することで決定され、たとえば、BCA Protein assay Kit（PIERCE社製）を使用し、タンパク質濃度を測定することによって決定される。具体的には、反応試薬2mLに対してサンプルを0.1mL加え、37

℃で30分間反応させ、分光光度計 (U l t r o s p e c 3 3 0 0 p r o、アマシヤム バイオサイエンス社製) を用いて、562nmにおける吸光度を測定する。コントロールとしては、通常、ウシ血清アルブミン (B S A) を使用し、検量線を作成する。このような手法により測定することができる。

【0034】

また抽出液中に含有される抽出物が哺乳動物培養細胞由来のものであるか否かは、たとえば、抽出液中のリボソームRNAの塩基配列解析を行うことによって判別することができる。

【0035】

本発明の抽出液は、哺乳動物培養細胞由来の抽出物をタンパク質濃度で10mg/mL～100mg/mL含有するとともに、20mM～300mMの酢酸カリウム、0.5mM～5mMの酢酸マグネシウム、0.5mM～5mMのDTT、0.01mM～5mMのPMSF、10mM～100mMのHEPES-KOH (pH6～8.5) を含有するように実現されるのが好ましい。

【0036】

本発明はまた、上記抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供するものである。本発明の方法にて得られた抽出液を用いてタンパク質合成反応を行うことによって、如何なるタンパク質、例えば生細胞で細胞毒となるタンパク質であっても、短時間にて合成することが可能となる。また、真核生物である哺乳動物培養細胞由来の抽出液を用いているため、糖タンパク質を無細胞系で合成することも可能であり、特に制限されることなく多くの種類のタンパク質を合成することができる。なお本発明における無細胞系タンパク質合成反応は、mRNAの情報を読み取ってタンパク質を合成する無細胞翻訳系のみによるタンパク質合成反応を指す。

【0037】

本発明の方法で得られる抽出液を用いて調製される無細胞系タンパク質合成反応液の組成に特に制限はなく、従来公知の組成を適宜選択すればよいが、上記抽出液が10(v/v)%～80(v/v)%、特に30(v/v)%～60(v/v)%含有されるように調製されるのが好ましい。すなわち、上記反応液の

全体において、哺乳動物培養細胞由来の抽出物の含有量が、タンパク質濃度で $0.1 \text{ mg/mL} \sim 160 \text{ mg/mL}$ となるように調製されるのが好ましく、 $3 \text{ mg/mL} \sim 60 \text{ mg/mL}$ となるように調製されるのがより好ましい。当該抽出物の含有量がタンパク質濃度で 0.1 mg/mL 未満または 160 mg/mL を越えると、目的のタンパク質の合成速度が低下する虞があるためである。

【0038】

無細胞系タンパク質合成反応液は、本発明の方法で得られた抽出液を除く成分として、外来 mRNA、カリウム塩、マグネシウム塩、DTT、アデノシン三リン酸、グアノシン三リン酸、クレアチンリン酸、クレアチンキナーゼ、アミノ酸成分、RNase インヒビター、tRNA、緩衝剤を少なくとも含有するのが好ましい。かかる反応液を使用して翻訳反応を行うことで、短時間で大量のタンパク質の合成が可能である。

【0039】

上記反応液に用いる外来 mRNA とは、抽出液を調製するのに用いた哺乳動物培養細胞に由来しない mRNA を指し、かかる哺乳動物培養細胞に由来しない mRNA であるならば、コードするタンパク質（ペプチドを含む）に特に制限はなく、毒性を有するタンパク質をコードするものであってもよいし、また糖タンパク質をコードするものであってもよい。なお、反応液に含有される mRNA が外来 mRNA であるか抽出液を調製するのに用いた哺乳動物培養細胞に由来する mRNA であるかは、まず、反応液中より、mRNA を単離精製後、逆転写酵素により cDNA を合成し、得られた cDNA の塩基配列を解析し、既知の外来 mRNA の塩基配列と比較することで判別することができる。

【0040】

なお反応液に用いる外来 mRNA は、その塩基数に特に制限はなく、目的とするタンパク質を合成し得るならば mRNA 全てが同じ塩基数でなくともよい。また、目的とするタンパク質を合成し得る程度に相同な配列であれば、各 mRNA は、複数個の塩基が欠失、置換、挿入または付加されたものであってよい。

【0041】

本発明に用いる外来 mRNA は、市販のものでもよいし、目的とするタンパク

質のORF (Open reading frame) を市販のベクター、たとえば、pTNT Vector (プロメガ社製) の5'- β グロビンリーダー配列の下流に挿入し、これを用いて転写反応で得られたmRNAを用いても構わない。また、転写反応の際にメチル化されたりボヌクレオチドなどを加えることにより付加されたキャップ構造を有する外来mRNAを用いてもよい。

【0042】

反応液中において、外来mRNAは、タンパク質合成の速度の観点から、 $1\mu\text{g}/\text{mL} \sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL} \sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより好ましい。外来mRNAが $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0043】

当該反応液中におけるカリウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のカリウム塩、好適には酢酸カリウム、を好ましく使用できる。カリウム塩は、上述した抽出用液におけるカリウム塩の場合と同様の観点から、当該反応液中において、 $10\text{mM} \sim 500\text{mM}$ 含有されることが好ましく、 $20\text{mM} \sim 300\text{mM}$ 含有されることがより好ましい。

【0044】

当該反応液中におけるマグネシウム塩としては、抽出用液の成分として上述した各種のマグネシウム塩、好適には酢酸マグネシウム、を好ましく使用できる。マグネシウム塩は、上述した抽出液におけるマグネシウム塩の場合と同様の観点から、当該反応液中において、 $0.1\text{mM} \sim 10\text{mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.5\text{mM} \sim 5\text{mM}$ 含有されることがより好ましい。

【0045】

当該反応液中におけるDTTは、上述した抽出用液におけるDTTの場合と同様の観点から、 $0.1\text{mM} \sim 10\text{mM}$ 含有されることが好ましく、 $0.5\text{mM} \sim 5\text{mM}$ 含有されることがより好ましい。

【0046】

当該反応液中におけるアデノシン三リン酸 (以下、「ATP」ということがあ

る。)は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において0.01mM~10mM含有されることが好ましく、0.1mM~5mM含有されることがより好ましい。ATPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0047】

当該反応液中におけるグアノシン三リン酸（以下、「GTP」ということがある。）は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において0.01mM~10mM含有されることが好ましく、0.05mM~5mM含有されることがより好ましい。GTPが0.01mM未満または10mMを越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0048】

当該反応液中におけるクレアチンリン酸は、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、ATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチンリン酸は、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において1mM~200mM含有されることが好ましく、10mM~100mM含有されることがより好ましい。クレアチンリン酸が1mM未満であると、十分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンリン酸が200mMを越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0049】

当該反応液中におけるクレアチンキナーゼは、タンパク質を継続的に合成するための成分であって、クレアチンリン酸と共にATPとGTPを再生する目的で配合される。クレアチンキナーゼは、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において1 μ g/mL~1000 μ g/mL含有されることが好ましく、10 μ g/mL~500 μ g/mL含有されることがより好ましい。クレアチンキナーゼが1 μ g/mL未満であると、十分な量のATPとGTPが再生されにくく、結果としてタンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためであり、またクレアチンキナーゼが1000 μ g/mLを越えると、阻害物質として働き、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0050】

当該反応液中におけるアミノ酸成分は、20種類のアミノ酸、すなわち、バリン、メチオニン、グルタミン酸、アラニン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシン、プロリン、イソロイシン、トリプトファン、アスパラギン、セリン、トレオニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、チロシン、リシン、グルタミン、シスチン、アルギニン、の20種類のアミノ酸を少なくとも含有する。このアミノ酸には、ラジオアイソトープ標識されたアミノ酸も含まれる。さらに、必要に応じて、修飾アミノ酸を含有していてもよい。当該アミノ酸成分は、通常、各種類のアミノ酸を概ね等量ずつ含有してなる。

本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において上記のアミノ酸成分が $1\mu\text{M}\sim 1000\mu\text{M}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{M}\sim 200\mu\text{M}$ 含有されることがより好ましい。アミノ酸成分が $1\mu\text{M}$ 未満または $1000\mu\text{M}$ を越えると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあるためである。

【0051】

当該反応液中におけるRNaseインヒビターは、抽出液に混在する哺乳動物培養細胞由来のRNaseによって、本発明の無細胞系タンパク質合成の際に外来mRNAやtRNAが不所望に消化されて、タンパク質の合成を妨げるのを防ぐ目的で配合されるものであり、当該反応液中において $0.1\text{U}/\mu\text{L}\sim 100\text{U}/\mu\text{L}$ 含有されることが好ましく、 $0.5\text{U}/\mu\text{L}\sim 10\text{U}/\mu\text{L}$ 含有されることがより好ましい。RNaseインヒビターが $0.1\text{U}/\mu\text{L}$ 未満であると、RNaseの分解活性を充分抑えることができない傾向にあるためであり、またRNaseインヒビターが $100\text{U}/\mu\text{L}$ を越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

【0052】

当該反応液中におけるtRNAは、上記20種類のアミノ酸に対応した種類のtRNAを概ね等量ずつ含有してなる。本発明においては、タンパク質合成の速度の観点から、当該反応液中において $1\mu\text{g}/\text{mL}\sim 1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることが好ましく、 $10\mu\text{g}/\text{mL}\sim 500\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有されることがより

好ましい。tRNAが $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 未満または $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ を越えると、タンパク質合成の速度が低下する傾向にあるためである。

【0053】

反応液に含有される緩衝剤としては、上述した本発明の抽出液と同様のものが好適に使用でき、同様の理由から、HEPES-KOH (pH 6~8.5) を使用するのが好ましい。また、緩衝剤は、上述した抽出液における緩衝剤の場合と同様の観点から、5mM~200mM含有されることが好ましく、10mM~100mM含有されることがより好ましい。

【0054】

さらに、反応液においては、翻訳反応速度を向上させる目的で、スperlミジンがさらに添加されたものであるのが好ましい。スperlミジンは、反応液中において0.01mM~10mM含有されることが好ましく、0.05mM~5mM含有されることがより好ましい。スperlミジンが0.01mM未満であると、十分な翻訳促進能が認められない傾向にあるためであり、また、スperlミジンが10mMを越えると、タンパク質合成反応を阻害する傾向にあるためである。

【0055】

すなわち、本発明の方法で得られた抽出液を使用した反応液としては、当該抽出液を30 (v/v) %~60 (v/v) %含有するとともに、20mM~300mMの酢酸カリウム、0.5mM~5mMの酢酸マグネシウム、0.5mM~5mMのDTT、0.1mM~5mMのATP、0.05mM~5mMのGTP、10mM~100mMのクレアチンリン酸、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ のクレアチンキナーゼ、 $10\mu\text{M}$ ~ $200\mu\text{M}$ のアミノ酸成分、 $0.5\text{U}/\mu\text{L}$ ~ $10\text{U}/\mu\text{L}$ のRNaseインヒビター、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ のtRNA、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ $500\mu\text{g}/\text{mL}$ の外来mRNA、10mM~100mMのHEPES-KOH (pH 6~8.5) を含有するように実現されるのが好ましい。また、上記に加えてさらに0.05mM~5mMのスperlミジン含有するように実現されるのがより好ましい。

【0056】

上記反応液を用いた無細胞系タンパク質合成反応は、従来公知のたとえば低温

恒温槽にて行う。反応温度は、通常、 10°C ～ 40°C 、好ましくは 20°C ～ 30°C の範囲内である。反応温度が 10°C 未満であると、タンパク質の合成速度が低下する傾向にあり、また反応温度が 40°C を越えると、必須な成分が変性する傾向にあるためである。反応の時間は、通常、1時間～72時間、好ましくは3時間～24時間である。

【0057】

上記反応液を使用して合成できるタンパク質に特に制限はない。合成されたタンパク質の量は、酵素の活性の測定、SDS-PAGE、免疫検定法などによって測定できる。

【0058】

本発明の無細胞系のタンパク質合成方法にて合成できるタンパク質に特に制限はない。

【0059】

【実施例】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

参考例 1

：哺乳動物培養細胞の培養

細胞数 2.1×10^6 個の哺乳動物培養細胞L5178Y-S（東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センターより分譲）を、10%ウシ胎児血清（Invitrogen社製）を含むRPMI1640培地（Invitrogen社製）が入った培養フラスコ（ 2100cm^2 ）内で 37°C 、5% CO_2 雰囲気下で70時間培養した。その結果、細胞数 4.2×10^8 個、湿重量0.57gとなった。

【0060】

実施例 1

：哺乳動物培養細胞抽出液の調製

まず、上記参考例1で培養した動物培養細胞を遠心分離（ $700 \times g$ 、10分間）により収集し、下記組成の洗浄液で3回洗浄（ $700 \times g$ 、10分間の条件

で遠心分離) した。

〔洗浄液の組成〕

- ・ 50 mM HEPES-KOH (pH 7.4)
- ・ 100 mM 酢酸カリウム
- ・ 2 mM 酢酸マグネシウム
- ・ 2 mM DTT

その後、上記組成の洗浄液に 0.57 mL の 0.5 mM PMSF および 20 % グリセロールを添加して調製した抽出用液 (4℃ に冷却) に、懸濁した。

この懸濁液を液体窒素中にて急激に (2 秒) 凍結させた。十分に凍結させた後、約 10℃ の水浴中で解凍した。完全に解凍した後、4℃、30,000×g で 10 分間遠心分離 (himac CR20B3、日立工機社製) して残渣を取除き、上清を回収した。得られた上清をさらに遠心分離 (4℃、30,000×g、30 分間) した後に回収した上清を、哺乳動物培養細胞抽出液とした。

【0061】

参考例 2

：外来 mRNA の作製

(1) ベクター DNA の構築

pGEM-luc Vector (プロメガ社製) 5 ng を鋳型とし、配列表配列番号 1 に示す塩基配列を有するプライマー (Luc T7-F3-Kpn) と、配列表配列番号 2 に示す塩基配列を有するプライマー (Luc T7-R4-Kpn) と、KOD plus (東洋紡績社製) を用いて、97℃ 15 秒、55℃ 30 秒、68℃ 120 秒、30 サイクルの PCR を行った。エタノール沈殿により DNA 断片を精製した後、Kpn I で消化した。これとは別に、pTNT

Vector (プロメガ社製) を Kpn I で消化した。これらの反応液をアガロースゲル電気泳動で分離した後、Gen Elute Gel Purification Kit (シグマ社製) を用いて DNA 断片を精製した。Ligation High (東洋紡績社製) を用いて、これらの DNA 断片をライゲーションした後、大腸菌 DH5α (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換した大腸菌からアルカリー SDS 法により調製したプラスミド DNA を、配列表配列

番号3に示す塩基配列を有するプライマー (T7 promoter) および Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS (アプライドバイオシステムズ社製) を用いてシーケンシング反応 (96℃ 10秒、50℃ 5秒、60℃ 4分、30サイクル) を行った。この反応液を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ社製) に供し、塩基配列解析を行った。pTNT Vector 由来の 5'-βグロビンリーダー配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子の開始コドンが挿入されたプラスミドを pTNT-Luc と命名した。

【0062】

(2) in vitro 転写反応

上記(1)で作製した pTNT-Luc を BamHI で消化した後、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した。得られた DNA 断片 1 μg を鋳型として、Ribomax Large Scale RNA Production System-T7 (プロメガ社製) を用い 20 μl スケールで 37℃ 4時間 mRNA を合成した。

【0063】

(3) 外来 mRNA の精製

上記転写反応後の反応液 20 μL に、1 U の RQ1 RNase free DNase (プロメガ社製) を添加し、37℃、15分間インキュベートし、鋳型 DNA を消化した。フェノールクロロホルム抽出によりタンパク質を除去した後、酢酸カリウムを最終濃度 0.3 M となるように添加し、エタノール沈殿を行った。得られた沈殿を 100 μL の滅菌水に溶解し、Nick Column (アマシャム バイオサイエンス社製) にアプライした。滅菌水 400 μL で溶出を行った。溶出画分を回収し、酢酸カリウムを最終濃度 0.3 M となるように添加し、エタノール沈殿を行った。合成された mRNA の定量は、260 nm の吸光度を測定して行った。

【0064】

実験例 1

：哺乳動物培養細胞抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成

実施例 1 で調製した哺乳動物培養細胞抽出液、および参考例 2 で合成した外来 mRNA を用いて、下記組成の反応液を調製し、無細胞系でのタンパク質合成を行った。

〔反応液の組成〕

- ・ 50 (v/v) % 哺乳動物培養細胞抽出液
- ・ 25 mM HEPES-KOH (pH 7.4)
- ・ 150 mM 酢酸カリウム
- ・ 1 mM 酢酸マグネシウム
- ・ 1 mM DTT
- ・ 0.5 mM ATP
- ・ 0.1 mM GTP
- ・ 20 mM クレアチンリン酸
- ・ 200 μ g/mL クレアチンキナーゼ
- ・ 0.25 mM スペルミジン
- ・ 40 μ M アミノ酸 (20 種)
- ・ 1 U/ μ L RNase インヒビター (ヒト胎盤由来)
- ・ 200 μ g/mL tRNA (酵母由来)
- ・ 240 μ g/mL 外来 mRNA
- ・ 10 (v/v) % グリセロール

ATP (シグマ社製)、GTP (シグマ社製)、アミノ酸 (20 種) (シグマ社製)、RNase インヒビター (宝酒造社製)、tRNA (ロシュ・ダイアグノスティックス社製) をそれぞれ用いた。反応装置として低温アルミブロック恒温槽 MG-1000 を用いた。反応液量は 25 μ L、反応温度は 20℃ とし、反応時間ごとにサンプリングを行い、合成されたルシフェラーゼ量を測定した。合成されたルシフェラーゼはルシフェラーゼアッセイキット (E-1500、プロメガ社製) を用いて定量した。ルシフェラーゼアッセイ試薬 50 μ L に反応液 2.5 μ L を添加し、ルミノメーター (Tuner Designs TD-20/20、プロメガ社製) を用いて、ルシフェラーゼによる発光を測定した。

結果、反応開始 1 時間で約 0.5 μ g/mL の無細胞系タンパク質合成に成功

した。

【0065】

比較例 1

参考例 1 と同様にして培養した哺乳動物培養細胞 L 5 1 7 8 Y-S を、実施例 1 と同様の洗浄液で洗浄した後、実施例 1 と同様の 4℃ に冷却した抽出用液に懸濁した。その後、5 分間激しく攪拌して抽出を行った以外は、実施例 1 と同様の操作で行った。無細胞系タンパク質合成反応は、参考例 2 で作製した mRNA を用いて、実験例 1 と同様の反応液組成で行った。

結果、ルシフェラーゼは 10 ng/mL と、実験例 1 の約 50 分の 1 程度であった。

【0066】

【発明の効果】

以上の説明で明らかなように、本発明によれば、調製が容易であり、かつ従来よりもタンパク質合成量の高い無細胞系タンパク質合成用哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法、および該哺乳動物培養細胞抽出液、ならびにこの哺乳動物培養細胞を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供することができる。

【0067】

【配列表のフリーテキスト】

配列番号 1:

プライマー L u c T 7 - F 3 - K p n

配列番号 2:

プライマー L u c T 7 - R 4 - K p n

配列番号 3:

プライマー T 7 p r o m o t e r

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RENG0 CO, LTD.

<120> culutured mammalian cell extract, and method for preparity same, m
ethod for producing proteins using same

<130> A5965

<160> 3

<210> 1

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Luc T7-F3-Kpn

<400> 1

ggggtaccat ggaagacgcc aaaaacataa 30

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Luc T7-R4-Kpn

<400> 2

ggggtacctt acaatttgga ctttccgcc 29

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T7 promoter

<400> 3

taatacgact cactataggc 20

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 調製が容易であり、かつ従来よりもタンパク質合成量の高い無細胞系タンパク質合成用の哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法、および該哺乳動物培養細胞抽出液、ならびにこの哺乳動物培養細胞抽出液を用いた無細胞系のタンパク質合成方法を提供する。

【解決手段】 抽出用液中に懸濁した哺乳動物培養細胞を急激に凍結させる工程を少なくとも含有する、哺乳動物培養細胞抽出液の調製方法、および該方法で調製された哺乳動物培養細胞抽出液、ならびに該抽出液を用いた無細胞系タンパク質合成方法。

【選択図】 なし

【書類名】	出願人名義変更届
【整理番号】	K1040335
【提出日】	平成16年 3月31日
【あて先】	特許庁長官 殿
【事件の表示】	
【出願番号】	特願2003-165390
【承継人】	
【識別番号】	000001993
【氏名又は名称】	株式会社島津製作所
【代表者】	服部 重彦
【電話番号】	075-823-1111
【手数料の表示】	
【予納台帳番号】	005050
【納付金額】	4,200円

特願 2003-165390

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000115980]

1. 変更年月日

1990年 8月23日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市福島区大開4丁目1番186号

氏 名

レンゴー株式会社

特願 2 0 0 3 - 1 6 5 3 9 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 9 9 3]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所